1 *ASSESSMENT OF GENETIC PREDISPOSITION FOR THE DEVELOPMENT*

2 *OF SEPTIC SHOCK IN BITCHES AFFECTED BY PYOMETRA.*

3 AUGUSTO C. D. DOS SANTOS, SANDRA C. B. DOS SANTOS, MARCELO

4 FAUSTINO, MARIANA S. F. TALIB, GENI C. PATRICIO, PATRICIA B. FLOR,

5 CLAIR M. OLIVEIRA, SILVIA R. G. CORTOPASSI

6

**Objetivos:** Identificar a presença de polimorfismos na região decodificadora do TNF-α e da IL-1β e correlacionar com as concentrações plasmáticas de TNF-α, IL-1β, IL-6 e proteína C reativa no momento do diagnóstico.

**Study design:** Clinical research, observational, prognostic study

**Animais:** Foram incluídas nove cadelas sem piometra utilizadas como controle e 85 cadelas com piometra, estratificadas em sepse, sepse grave e choque séptico, de acordo com a gravidade.

**Materiais e Métodos:** O diagnóstico foi realizado a partir do histórico, dos sinais clínicos identificados por meio do exame físico e ultrassonografia abdominal. As amostras de sangue utilizadas para as análises laboratoriais foram coletadas no momento do diagnóstico. O polimorfismo do TNF-α estudado foi o rs22216185 localizado no cromossomo 12 região 1074090 e o da IL-1β estudado foi o rs22530594 localizado no cromossomo 17 região 37024327, a identificação foi realizada por PCR em tempo real e as concentrações plasmáticas por metodologia ELISA.

**Resultados:** Todos os animais incluídos na pesquisa foram homozigotos AA para o gene do TNF-α, desta forma não foi possível correlacionar a presença de polimorfismos com os níveis dosados de TNF-α, IL-1β, IL-6 e proteína C reativa. A análise do gene da IL-1β apresentou frequência do genótipo AA de 21,3%, do GG de 42,6% e AG de 36,2%. A correlação dos genótipos da IL-1β com as concentrações de TNF-α, IL-6 e proteína C reativa não apresentaram diferenças significativas. Porém, demonstrou que os animais em sepse com o alelo GG (média 2,394 ± 0,675) apresentam níveis séricos de IL-1β mais elevados quando comparado com AA (média 0,513 ± 0,104) e AG (média 0,599 ± 0,499).

32 **Conclusões e relevância clinica:** Foi possível concluir que o genótipo GG
33 do gene da IL-1β aumenta a produção de IL-1β nas cadelas com piometra.,
34 possivelmente contribuindo para o desenvolvimento do choque séptico.
35 **Palavras-chave:** Cadelas, piometra, sepse, inflamação, genética,
36 polimorfismo.
37 **Protocolo CEUA institucional nº:** 2471/2011
38 **Fonte de fomento:** À FAPESP (2012/00272-8) pelo auxílio financeiro
39

40 **Introdução:** A piometra canina é uma infecção bacteriana que acomete o
41 útero de cadelas sexualmente maduras e atinge aproximadamente 50% dos
42 animais não castrados antes dos dez anos de idade. A infecção uterina,
43 somada a resposta imune do hospedeiro gera a síndrome clínica conhecida
44 como sepse e síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS). Quando
45 não tratada adequadamente ocorre a progressão da doença para estágios
46 mais graves como a sepse grave, condição responsável pela disfunção de um
47 ou mais órgãos e o choque séptico caracterizado por insuficiência
48 circulatória aguda e hipotensão arterial não responsiva à reposição volêmica.
49 Algumas condições influenciam diretamente a gravidade como a
50 predisposição do hospedeiro, o tipo de insulto, a resposta do hospedeiro ao
51 insulto infeccioso, o grau de resposta inflamatória do hospedeiro e a
52 disfunção de órgãos que ocorre secundário à infecção. O adequado
53 reconhecimento da gravidade do caso é fator determinante sobre a vida dos
54 pacientes, no prognóstico, diminuição no tempo de internação e custo do
55 tratamento. Tem-se demonstrado que a conduta terapêutica não deve ser
56 baseada apenas em avaliações clínicas e rotineiras como a frequência
57 cardíaca, pressão arterial, coloração de mucosas e débito urinário, sendo

58 necessário obter variáveis de oxigenação e perfusão tecidual, provas de
59 resposta inflamatória, lactato, bem como os níveis séricos dos biomarcadores
60 da resposta inflamatória. A hipótese é que os cães apresentam mutações
61 genéticas que alteram a produção de TNF-α e Il-1β afetando de diferentes
62 formas o metabolismo dos animais acometidos por infecção bacteriana. Para
63 tal, um estudo que integre as avaliações clínicas e laboratoriais rotineiras à
64 investigação dos polimorfismos genéticos do gene do TNF-α e da IL-1β com
65 os níveis plasmáticos de TNF-α, IL-1β, IL-6 e proteína C reativa no momento
66 do diagnóstico da piometra em diferentes animais da espécie canina é de
67 grande valia para a compreensão da doença e correta instituição correta da
68 terapia.
69 **Material and methods:** O protocolo experimental foi submetido e aprovado
70 pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - nº 2471/2011) da
71 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São
72 Paulo (FMVZ/USP).
73 Foram atendidas 253 cadelas e diagnósticas com piometra, os animais que
74 não foi possível realizar todas as coletas necessárias para a pesquisa ou não
75 foi possível manter o padrão das análises, que o proprietário optou pela
76 eutanásia e que apresentavam doenças pré-existentes como neoplasias,
77 diabetes, insuficiência renal e cardiomiopatia com utilização de terapia
78 medicamentosa, não foram incluídos na pesquisa. Desta forma, somente 94
79 cadelas com piometra foram utilizadas, a afecção foi diagnosticada a partir
80 do histórico e dos sinais clínicos identificados por meio do exame físico e
81 ultrassonografia abdominal. As avaliações laboratoriais, hematológica e
82 bioquímica corroboraram com a caracterização da gravidade da doença e
83 inclusão dos animais em um dos quatro grupos estudados. Todos os

84 parâmetros descritos para determinação do critério de inclusão foram
85 avaliados na admissão. Neste momento nove cadelas incluídas foram
86 estratificadas em controle sem piometra e 85 com piometra estratificadas de
87 acordo com a gravidade do caso em sepse, sepse grave ou choque séptico. A
88 categorização dos animais em sepse foi realizada quando havia infecção
89 acompanhada pela presença da SIRS (NGUYEN et al., 2006). A SIRS é
90 definida como a presença de duas ou mais das seguintes características: a
91 presença de mucosas congestas, temperatura retal menor que 38,1°C ou
92 maior que 39,2°C, taquicardia (frequência cardíaca maior que 120 bpm),
93 taquipneia (frequência respiratória maior que 20 movimentos respiratórios
94 por minuto), alteração do nível de consciência, hipoalbuminemia, edema
95 significante, hiperglicemia na ausência de diabetes, número de leucócitos
96 maior que 16.000/mm$^3$ ou menor que 6.000/mm$^3$ ou a presença de
97 bastonetes maior que 3%.

98 A sepse grave foi definida como a presença de SIRS e uma ou mais disfunção
99 de órgãos. A disfunção de órgãos pode ser caracterizada pela lesão pulmonar
100 (relação $PaO_2/FIO_2$ < 100mmHg) ou presença de pneumonia,
101 trombocitopenia (contagem de plaquetas menor que 200.000 /µl), anemia
102 (valor de hemoglobina menor que 12 g/dl), estado mental alterado,
103 hipoperfusão com acidose lática (níveis séricos de lactato superiores a 2,5
104 mmol/L), falência renal (níveis séricos de creatinina acima de 1,6 mg/dl),
105 falência hepática (níveis séricos de fosfatase alcalina acima de 150 U/L),
106 falência cardíaca ou arritmias.

107 O choque séptico foi definido na presença de sepse grave e hipotensão
108 refratária, caracterizada por pressão arterial sistólica (PAS) menor que 90
109 mmHg, pressão arterial média (PAM) menor que 65 mmHg ou a diminuição

110 de 40 mmHg na PAS comparada ao valor inicial e irresponsiva ao aumento
111 da fluidoterapia com cristalóide de 20 para 40 ml/kg.
112 Para as dosagens de proteína C reativa, de TNF-α, de IL-1β e de IL-6
113 presentes no soro foi utilizado método *Enzyme Linked Immuno Sorbent*
114 *Assay* (ELISA), seguindo rigorosamente as recomendações do fabricante.
115 A amostra do DNA foi obtida através da coleta de sangue da veia jugular
116 externa em tubo contendo EDTA[7] no momento do atendimento inicial.
117 Imediatamente após a coleta, o sangue foi armazenado em temperatura
118 inferior a -70°C e para a extração do DNA foi utilizado metodologia por
119 coluna com o kit DNeasy[1].
120 O polimorfismo do TNF-α estudado foi o rs22216185 localizado no
121 cromossomo 12 região 1074090, a sequência utilizada para gerar o arquivo
122 foi:
123 TGGGGTCCAGTCTCCAGGGTCCTAC[A/
124 C]CAATGTACNCAGCAGTGACTGGCCC
125 O polimorfismo da IL-1β estudado foi o rs22530594 localizado no
126 cromossomo 17 região 37024327, a sequência utilizada para gerar o arquivo
127 foi:
128 AGCCATAATCTCAGGCAGAGAGGAA[A/
129 G]GGAGAGAGGGAGAAAGAGACAGAC
130 Após a definição dos genes a serem estudados foi feito o desenho dos
131 primers específicos. Para isso, a seqüência do DNA foi resgatada em formato
132 FASTA por meio do site http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview. O desenho
133 dos *primers* foi realizado com o auxílio do programa *file builder* desenvolvido
134 pela *Life Technologies*, EUA que se encontra disponível pelo endereço

1 [1] DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen, Texas, Estados Unidos

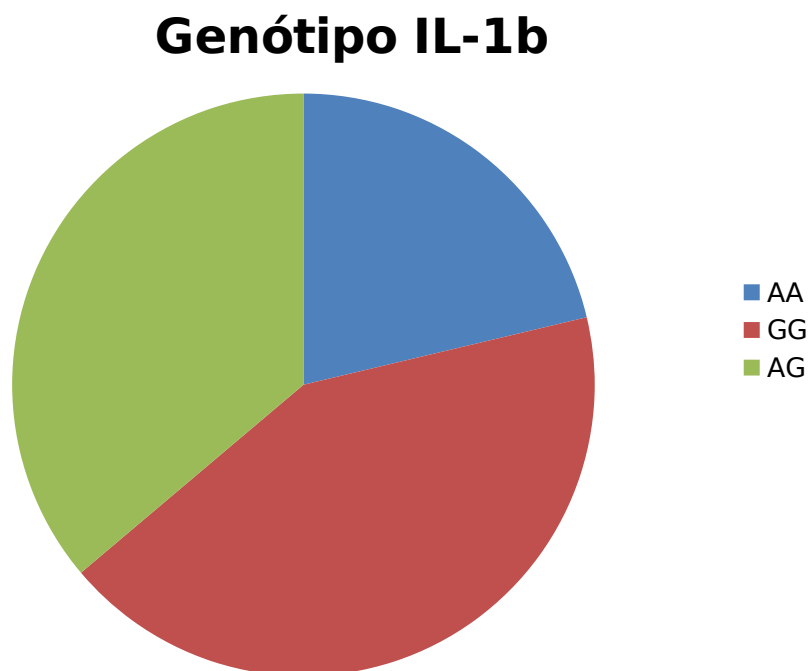
135 http://www6.appliedbiosystems.com/support/software/assaysbydesign/
136 installs.cfm.
137 A combinação de primers mais específica foi determinada pelo programa de
138 comparação de seqüências denominado *BLAST* (Basic Local Alignment
139 Search tool) que se encontra disponível pelo endereço
140 www.ncbi.nln.nih.gov/BLAST. Os primers foram sintetizados pela *Life*
141 *Technologies (*Brasil).
142 A genotipagem dos polimorfismos foi realizada pelo método TaqMan®[2],
143 utilizando entre 1 e 20 ng de DNA por amostra.
144 O teste de *Shapiro-Wilk* foi utilizado para testar a normalidade das variáveis
145 quantitativas. O teste do Qui Quadrado e Exato de Fisher foram utilizados
146 para verificar a associação entre os genótipos e a gravidade da sepse. As
147 análises foram realizadas utilizando o pacote estatístico SPSS – Statistical
148 Package for Social Sciences[3].
149
150 **Resultados:** Foram incluídos na pesquisa 94 animais, sendo que nove
151 (9,57%) foram animais sem piometra e utilizados como controle, 23 (24,4%)
152 estavam em sepse, 60 (63,82%) animais estavam em sepse grave e dois
153 (2,12%) animais estavam em choque séptico. Dos animais com piometra e em
154 sepse os sintomas mais comuns relatados foram o corrimento vaginal
155 (100%), poliúria (69,5%), polidipsia (69,5%) e com início dos sintomas não
156 excedendo uma semana Dos animais que apresentavam piometra e estavam
157 em sepse grave os sintomas relatados o corrimento vaginal estava presente
158 em 45 animais (75,0%), poliúria (91,6%), polidipsia (91,6%), hiporexia (55%),
159 apatia (33,3%) e o inicio dos sintomas variou de uma a três semanas.

2 [2] TaqMan®, Life Technologies, São Paulo, Brasil
3 [3] SPSS Statistics Desktop v.18.0, IBM Corporation, Nova Iorque, Estados Unidos

160 Dois animais foram atendidos em choque séptico, dentre os sintomas
161 apresentados a apatia era evidente em ambos, os proprietários relataram
162 hiporexia e início dos sintomas há três semanas. Ambos os animais foram a
163 óbito, sendo um antes do tratamento cirúrgico por hemorragia de via aérea
164 superior e o outro 12 horas após a cirurgia por falência múltipla de órgãos.

165 O número de disfunções orgânicas dos 60 animais com sepse grave no
166 atendimento inicial variou de um a oito, com média e desvio padrão de 4
167 ±1,47. Das disfunções orgânicas mais frequentes, o nível sérico de lactato
168 aumentado (igual ou maior que 2,5 mmol) foi observado em 51 (85%)
169 animais, 29 (48,3%) apresentavam trombocitopenia, sendo que 12 (20%)
170 apresentavam trombocitopenia leve [contagem de plaquetas (CP) entre 150
171 – 200 $x10^{3}$/uL], seis (10%) trombocitopenia moderada (CP entre 100 – 149
172 $x10^{3}$/uL) e 12 (20%) trombocitopenia grave (CP < 100 $x10^{3}$/uL). A anemia
173 foi identificada em 23 (38,3%) animais, sendo 12 (20%) com anemia leve
174 [hemoglobina (Hg) entre 9,0 e 11,0 g/dl], seis (10%) com anemia moderada
175 (Hg entre 7,0 e 9,0 g/dl), três (5%) com anemia grave (Hg < 7,0 g/dl) e dois
176 (3,3%) com anemia muito grave (Hg < 4,0 g/dl). Dentre outras alterações, a
177 hipoalbuminemia (48,4%), uremia (56,6%), aumento da fosfatase alcalina
178 (31,6%), diminuição da creatinina (20%), aumento da creatinina (15%),
179 hipoglicemia (11,6%), hiperglicemia (13,3%), edema pulmonar (1,6%),
180 pneumonia (1,6%), arritmias (1,6%) e mioclonias (1,6%) também foram
181 observadas. Nos animais com sepse grave, que 25% dos animais estavam
182 com piometra de cérvix fechada, 31,6% ficaram internados, 20% possuíam
183 o útero rompido e 26,6% necessitaram de transfusão de sangue total ou
184 hemoderivados.

185 Todos os animais incluídos na pesquisa foram homozigotos AA para o gene
186 do TNF-α, desta forma não foi possível correlacionar a presença de
187 polimorfismos com a gravidade do caso e os
188 A análise dos genótipos do polimorfismo referente ao gene da IL-1β das
189 cadelas incluídas na pesquisa independente da gravidade apresentou a
190 frequência do alelo A de 39,36% e do alelo G de 60,64%
191

Figura 40 - Representação gráfica demonstrando a frequência dos genótipos referente ao gene da IL-1β das cadelas incluídas na pesquisa independente da gravidade

Fonte: (SANTOS, A. C. D. dos, 2014)

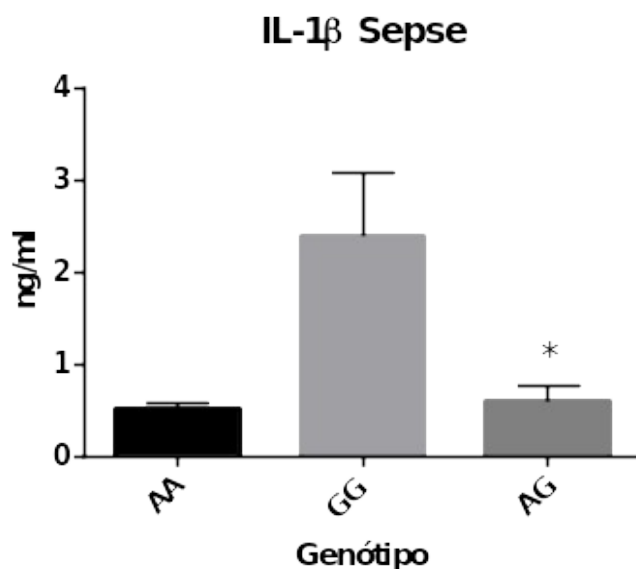
Não foram encontradas diferenças significativas entre os genótipos referente ao polimorfismo do gene da IL-1β e os níveis dosados de TNF-α, IL-1β, IL-6, CRP de maneira independente da gravidade.

Não foi encontrada associação significativa entre a gravidade da sepse e os genótipos referentes ao polimorfismo do gene da IL-1β. Devido à pequena quantidade de indivíduos em choque séptico, uma análise separada comparando apenas os animais controle, em sepse e em sepse grave foi realizada. Porém, mesmo após a exclusão da categoria choque séptico, não foi encontrada associação entre o genótipo e a gravidade

Foi encontrado efeito significativo dos genótipos do gene da IL-1β sobre os níveis de IL-1β nas cadelas com piometra em sepse. Os animais com o genótipo GG apresentaram níveis de IL-1β significativamente maiores do que os animais com o genótipo AG.

211 Não foi observado efeito significativo do genótipo do gene da IL-1β sobre os

212 níveis de IL-6 e CRP nas cadelas com piometra em sepse.

213 Figura 52 - Representação gráfica demonstrando valores médios e respectivos desvios-padrão
214 dos níveis dosados de interleucina 1 beta (IL-1β - ng/ml) e a associação entre os
215 genótipos referente ao gene da IL-1β das cadelas com piometra em sepse – São
216 Paulo – 2012/2014
217

218

219 Não foi observado efeito significativo do genótipo do gene da IL-1β sobre os

220 níveis de TNF-α, IL-1β, IL-6, CRP, nas cadelas com piometra em sepse grave.

221

222 **Discussão:**A avaliação da genotipagem do TNF-α não encontrou nenhum
223 animal com polimorfismo, sendo todos os animais incluidos no estudo
224 homozigotos AA. No estudo de Watanabe et al. (2005) a avaliação de 150
225 seres humanos encontrou apenas 2 (1,3%) heterozigotos GA, sendo 148
226 (98,7%) homozigotos GG. No presente estudo não é possível afirmar sobre a
227 presença de polimorfismos ligados ao TNF-α, porém quando confrontamos os
228 resultados aos encontrados nos seres humanos é possível que a frequência do
229 polimorfismo seja de baixa incidência.
230 O estudo do polimorfismo da IL-1β apresentou 20 (21,3%) animais

231 homozigotos AA, 40 (42,6%) animais homozigotos GG e 34 (36,2%) animais

232 heterozigotos AG. Os resultados foram semelhantes aos encontrados por

233 Watanabe et al. (2005) em seres humanos, porém os alelos eram diferentes.

234 No estudo envolvendo 150 pacientes foi observado 53 (35,3%) pacientes
235 homozigotos CC, 25 (16,7%) pacientes homozigotos TT e 72 (48%) pacientes
236 heterozigotos CT; e não foi possível correlacionar os achados com a
237 gravidade do caso.
238 Quando avaliamos os genótipos e os animais do mesmo grupo sepse, os
239 animais com o genótipo GG apresentaram níveis significativamente mais
240 elevados de IL-1β quando comparados aos genótipos AA e AG. Segundo
241 Watanabe e colaboradores (2005), a IL-1β encontra-se aumentada nos
242 estágios iniciais da sepse e inflamação. Desta forma, os animais em sepse
243 homozigotos GG podem evoluir mais rapidamente para sepse grave do que
244 os animais que não possuem este genótipo.
245 Esta é a primeira pesquisa na Medicina Veterinária que estudou a influência
246 genética na gravidade da sepse. Existe uma grande variedade de citocinas e
247 para cada citocina existe uma grande variação genética com diferentes
248 polimorfismos para o mesmo gene, com a capacidade de aumentar ou
249 diminuir a sua expressão. A presente pesquisa analisou somente um
250 polimorfismo para o gene do TNF-α e um para a IL-1β. Desta forma,
251 pesquisas clinicas com a informação genética são cada vez mais relevantes
252 para montar um painel da atividade dos genes, correlacionar a influencia que
253 os polimorfismos exercem na expressão dos genes com a consequente
254 produção ou não das citocinas e consequências sobre a gravidade do caso.
255 **Conclusões:** A gravidade dos pacientes no momento do atendimento possui
256 origem multifatorial; porém o polimorfismo do gene da IL-1β para o alelo GG
257 influenciou diretamente a concentração da IL-1β circulante nos animais em
258 sepse predispondo a maior gravidade e o inicio dos sintomas dos animais em
259 sepse.